دوره سیزدهم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.46882.1679

تأثیر کلسترول لود شده روی سیکلودکسترین بر پاسخ شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی گربه

مریم رهبر[۱]، فرید براتی[۲*]، قدرت‌الله محمدی[۳] و بهمن مصلی‌نژاد[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳

چکیده

کلسترول لود شده بر سیکلودکسترین (CLC) به صورت کارآمد توانسته است از اسپرم تعدادی از گونه‌ها محافظت کند. همچنین شیشه‌ای کردن اسپرم به خصوص در انسان، افق‌های جدیدی را در زمینه‌ی انجماد اسپرم گشوده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر CLC بر شیشه‌ای‌سازی اسپرم گربه می‌باشد. اسپرم اپیدیدیمی گربه (۲۲ زوج بیضه) از اپیدیدیم استخراج شد و سپس در معرض شیشه‌ای شدن در محلول تریس به همراه CLC قرار گرفت. اسپرم ذوب شده از نظر زنده‌مانی، تحرک و مورفولوژی ارزیابی شد. شیشه‌ای شدن به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) باعث کاهش درصد تحرک اسپرم در گروه واجد CLC (۳/۶±۲/۲۸) و گروه فاقد CLC (۱/۱±۲/۰۲) در مقایسه با اسپرم تازه (۲۸/۳±۱/۸۲) شد. زنده‌مانی نیز به دنبال شیشه‌ای شدن به صورت معنی‌داری هم در گروه واجد CLC (۸۰/۶±۲/۴۴) و هم گروه فاقد CLC (۷۸/۲±۲/۱۵) در مقایسه با قبل از انجماد (۸۹/۹±۱/۹۴) کاهش یافت (P=۰/۰۰۱۱). با وجود افت شدیدی که در پارامترهای مورد مطالعه در پی شیشه‌ای‌سازی به وجود آمد، به نظر می‌رسد اسپرم گربه در مقابل فرآیند شیشه‌ای شدن دارای تحملی ذاتی است و حضور CLC تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی بهبود آن نداشته است.

کلمات کلیدی: اسپرم اپیدیدیمی، سیکلودکسترین، شیشه‌ای شدن، گربه

مقدمه

با توجه به فراوانی گونه‌های در حال انقراض حیات وحش، گربه‌ی بومی ایران به عنوان یک گوشت‌خوار می‌تواند یک الگوی مناسب برای کمک به حفظ گونه‌های گوشت‌خوار در معرض انقراض باشد. از ملزومات آن تهیه‌ی بانک‌های اسپرم می‌باشد که همگی بر اساس روندهای انجماد اسپرم پایه‌گذاری شده‌اند. در برنامه‌های معمول انجماد جهت محافظت از اسپرم می‌بایست از دستگاه‌های قابل برنامه‌ریزی استفاده نمود که هزینه‌های بالایی دارند (Isachenko et al. 2011) و از طرف دیگر جهت حفاظت از غشای سلولی می‌بایست از سرمامحافظ‌های شیمیایی مانند گلیسرول و اتیلن‌گلیکول استفاده کرد که بسیار سمی هستند (Isachenko et al. 2003) و یا از سرمامحافظ‌های با منشاء بیولوژیک استفاده کرد که خطر انتقال بیماری‌ها را دارند. برای حل مشکلات فوق، استفاده از شیشه‌ای کردن هم ارزان قیمت‌تر و هم مؤثرتر از روش‌های معمول است. اخیراً مطالعات انجام شده، نشان داده‌اند که اسپرم را نیز می‌توان با روش شیشه‌ای کردن منجمد نمود و همچنین حذف سرمامحافظ‌های معمول نیز تأثیر نامطلوبی بر روند شیشه‌ای‌سازی اسپرم نداشته است (Isachenko et al. 2012). فرآیند انجماد منجر به تغییر در ساختار غشاء می‌شود، بنابراین پروتئین و لیپیدهای وابسته به آن آسیب دیده و در نتیجه سبب از دست دادن

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
[۲*] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: fabrtir@yahoo.com
[۳] دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

نفوذپذیری انتخابی غشاء و تغییر در سیالیت غشاء می‌شود. همچنین در طی روند انجماد، میزان کلسترول غشای سلول کاهش می‌یابد (Cormier and Bailey 2003). از سوی دیگر، مطالعات انجام شده نشان دهنده‌ی این است که در گونه‌هایی که نسبت کلسترول به فسفولیپید غشاء بیش‌تر است (مانند انسان و خرگوش) نسبت به گونه‌هایی که این نسبت کم‌تر است (مانند نریان، گاو و قوچ) مقاومت بیش‌تری در برابر فرایند انجماد وجود دارد (Watson 2000). با توجه به این اطلاعات، غنی‌سازی غشای اسپرم با کلسترول قبل از انجماد ممکن است صدمات ایجاد شده در طی انجماد را کاهش دهد (Moore et al. 2005). کلسترول در محلول‌های آبی غیرقابل حل است، اما می‌توان آن را با استفاده از سیکلودکسترین وارد غشای سلول کرد (Belmonte et al. 2005). هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر استفاده از کلسترول لود شده بر متیل‌بتاسیکلودکسترین در محافظت از غشای سلول در برابر آسیب‌های ناشی از فرایند شیشه‌ای شدن می‌باشد.

مواد و روش کار

محلول تریس[1]، BSA[2]، سوکروز[3]، کلسترول[4]، متیل-بتاسیکلودکسترین[5]، کلروفورم[6]، فرمالین[7]، متانول[8] (پارس شیمی، تهران، ایران)، آب دیونیزه، نیتروژن مایع، رنگ گیمسا (بهار افشان، ایران)، رنگ ائوزین و رنگ نگروزین، جنتامایسین[9]، محلول سالین ۰/۹ درصد و استراو فرانسوی[10].

نحوه‌ی آماده‌سازی محیط و محلول‌ها به این شرح است که محیط تریس به عنوان محیط استخراج اسپرم، محیط پایه و محیط انجماد استفاده گردید. اجزای تشکیل دهنده‌ی محیط شامل (در میلی‌لیتر) ۲۴ میلی‌گرم تریس (هیدروکسی‌متیل) آمینومتان[11]، ۱۰ میلی‌گرم سیتریک-۸ میلی‌گرم گلوکز[13] و ۱ میکرولیتر جنتامایسین به همراه ۱۰ میلی‌گرم BSA (در میلی‌لیتر) می‌باشد که pH آن در محدوده‌ی ۷/۲- ۶/۸ تنظیم گردید، این محیط حداکثر به مدت ۳ روز برای استفاده در دمای یخچال نگهداری می‌شد. محلول دیگری که استفاده شد محلول سوکروز بود که از این محلول به عنوان سرمامحافظ در فرآیند شیشه‌ای شدن استفاده گردید (Isachenko et al. 2011, Sanchez et al. 2011). محلول سوکروز استفاده شده دارای غلظت ۰/۴ مولار بود که از ترکیب ۱۳۶/۹۲ میلی‌گرم سوکروز در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه‌ی استریل تهیه گردید و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه‌ی کلسترول بارگذاری شده بر متیل-بتاسیکلودکسترین بر اساس روش توصیف شده توسط Purdy و Graham عمل شد (Purdy and Graham 2004). به این ترتیب که ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم کلسترول با ۱ میلی‌لیتر کلروفورم ترکیب شد. سپس ۴۵۰ میکرولیتر از این محلول به ۲ میلی‌لیتر متانول حاوی ۱ گرم متیل-بتاسیکلودکسترین اضافه گردید و تا زمان شفاف شدن، مخلوط می‌گردید. لازم به ذکر است که در صورت عدم شفاف شدن محلول فوق می‌بایست به آرامی به آن، به صورت قطره قطره کلروفورم اضافه شود. در مرحله‌ی بعد، محلول شفاف شده به یک پتری‌دیش شیشه‌ای منتقل شد و به منظور کریستالی شدن، به مدت ۲-۱ روز در دمای ۳۹-۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. کریستال‌های تشکیل شده تا زمان استفاده در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

محلول کاربر حسب روند انجام کار به صورت تازه با اضافه کردن ۵۰ میلی‌گرم CLC به ۱ میلی‌لیتر محلول تریس ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه شد و به مدت ۳۰ ثانیه

1- Tris
2- Sigma-Aldrich, USA
3- Sucrose, Sisco Research Laboratories, India
4- Cholesterol, Panreac, Spain
5- Methyl-β-cyclodextrin, Across, New Jersey, USA
6- Chloroform, Merck, Germany
7- Formalin, Merck, Germany
8- Methanol, Merck, Germany
9- Gentamisin,Darou-pakhsh, Iran
10- IMV Technology; France

11- Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
12- Citric acid, Merck, Germany
13- Glucose, Merck, Germany

ورتکس گردید (Purdy and Graham 2004) و سپس با فیلتر ۰/۲ میکرومتری استریل شد.

به منظور انجام این تحقیق، تعداد ۲۲ زوج بیضه به همراه اپیدیدیم از گربه‌های نر بالغ اخذ گردید. ابتدا دم اپیدیدیم از کل آن جدا گردید. در مرحله‌ی بعد دم‌های اپیدیدیم به درون یک پتری‌دیش حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط پایه‌ی تریس ۳۱ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و به وسیله‌ی اسکالپل قطعه قطعه شدند و سپس دم‌های اپیدیدیم خارج و محلول حاوی اسپرم، آماده‌ی ارزیابی اولیه گردید (Guerrero 2006). پس از جداسازی اسپرم-ها از دم اپیدیدیم، ابتدا تحرک اسپرم تخمین زده شد. برای تخمین درصد تحرک پیشرونده‌ی اسپرم، پس از یکنواخت کردن نمونه، یک قطره از سوسپانسیون اسپرم بر روی یک لام گرم شده قرار داده شد و با مشاهده‌ی ۳-۲ میدان میکروسکوپی (هر فیلد به مدت ۳۰ ثانیه مشاهده می‌گردید) درصد تحرک پیشرونده‌ی اسپرم تخمین زده شد (Kim et al. 2012).

برای بررسی زنده‌مانی، ابتدا حجم مساوی از رنگ ائوزین-نگروزین (به ترتیب ۳ و ۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و سوسپانسیون اسپرم استخراج شده (هر کدام ۲۵ میکرولیتر) روی لام مخلوط گردید، سپس یک گسترش نازک از آن تهیه شد و سریعاً روی شعله‌ی چراغ الکلی خشک گردید. در بررسی میکروسکوپیک لام، اسپرم‌های صورتی یا قرمز رنگ به عنوان اسپرم‌های مرده و اسپرم‌های سفید رنگ به عنوان اسپرم‌های زنده شمارش شدند (محمدی و براتی ۱۳۸۸). با استفاده از بزرگنمایی ۴۰۰× به صورت تصادفی تعداد ۱۰۰ اسپرم مرده و زنده در میدان‌های مختلف میکروسکوپی شمارش گردید و در نهایت درصد زنده‌مانی اسپرم محاسبه گردید.

با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم بررسی گردید. برای رنگ‌آمیزی ابتدا یک گسترش نازک از سوسپانسیون اسپرم استخراج شده، تهیه گردید. پس از خشک شدن گسترش تهیه شده در مجاورت هوا در دمای اتاق، با استفاده از متانول خالص گسترش روی لام فیکس شد. سپس لام تهیه شده به مدت ۶۰ دقیقه در رنگ گیمسا (۲۰ درصد) قرار داده شد و پس از رنگ‌آمیزی در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× مورد بررسی قرار گرفت (محمدی و براتی ۱۳۸۸). ناهنجاری‌های سر اسپرم، سرکنده شده، قسمت میانی اسپرم، دم اسپرم و نیز قطرات سیتوپلاسمی به دقت و به صورت جداگانه بررسی شدند. بدین منظور، برای بررسی ناهنجاری‌های هر قسمت به صورت تصادفی تعداد ۱۰۰ اسپرم در میدان‌های مختلف میکروسکوپی ارزیابی شد و در نهایت درصد ناهنجاری‌های هر قسمت محاسبه گردید.

پس از تعیین غلظت اسپرم با استفاده از روش هموسیتومتری، حجم اسپرم حاوی ۴۰ میلیون اسپرم تعیین گردید. سپس حجم مورد نظر به وسیله‌ی محلول تریس ذکر شده به یک میلی‌لیتر رسانده شد و سپس به ۲ گروه تقسیم شد. به گروه اول CLC (۲ میلی‌گرم سیکلودکسترین به ازای ۱۲۰ میلیون اسپرم) و گروه دوم به جای سیکلودکسترین محلول تریس اضافه گردید. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند (Moce et al. 2010, Purdy and Graham 2004). در ادامه به نسبت ۱:۱ با محلول تریس رقیق شدند و به این ترتیب غلظت آن‌ها به ۲۰ میلیون اسپرم - رسید. در مرحله‌ی بعد به نسبت ۱:۱ محلول سوکروز ۰/۴ مولار اضافه شد (Isachenko et al. 2011) و به این ترتیب غلظت نهایی اسپرم در ۲ گروه ۱۰ میلیون و غلظت نهایی سوکروز ۰/۲ مولار بود. سپس حداقل به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند (Isachenko et al. 2011). هر کدام از گروه‌ها در استراو ۰/۲۵ میلی‌لیتری شرکت IMV فرانسه به صورت مجزا بسته‌بندی شدند.

قبل از فرایند شیشه‌ای شدن، ۱ سانتی‌متر نزدیک به بخش انتهایی بسته شده‌ی استراو، با مارکر مشخص شد. سپس سوسپانسیون اسپرم یکنواخت شد. یک سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری در انتهای بسته شده‌ی استراو قرار داده شد و از طریق آسپیراسیون، محلول اسپرم به درون استراو کشیده

شد. آسپیراسیون محلول تا زمان پر شدن خط مشخص شده روی استراو ادامه داشت و سپس استراو پرشده در حالی که همچنان آسپیراسیون هوا ادامه داشت از درون محلول خارج شد و در نهایت انتهای باز استراو بسته شد (Isachenko et al. 2011).

برای انجام فرایند شیشه‌ای شدن ابتدا مقداری نیتروژن مایع[1] به درون محفظه‌ی انجماد که قبلاً یک رک در آن گذاشته شده بود، ریخته شد و در محفظه به مدت ۳ دقیقه بسته نگه داشته شد تا فضای درونی محفظه و رک هر دو سرد شوند. پس از گذشت این مدت زمان، دوباره مقداری نیتروژن مایع به درون محفظه اضافه گردید به گونه‌ای که ارتفاع سطح نیتروژن حدود ۲ سانتی‌متر پایین‌تر از سطح رک باشد. سپس استراو به صورت افقی بر روی رک فوق سرد و بخار نیتروژن قرار داده شدند و پس از گذشت مدت زمان ۳ دقیقه، از قسمت انتهایی به وسیله‌ی یک پنس از روی رک به داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند (Kim et al. 2012).

به منظور ذوب کردن استراوها به مدت ۲۰ ثانیه درون حمام آب ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد غوطه‌ور شدند (Isachenko et al, 2011).

از هر گروه یک استراو بعد از ذوب شدن به درون میکروتیوب تخلیه شد و محلول خارج شده مورد ارزیابی‌های کیفی فوری پس از شیشه‌ای شدن قرار گرفت.

نسبت پارامترهای مختلف اسپرم بعد از انجماد به قبل از انجماد بین دو گروه واجد CLC و فاقد CLC به روش آزمون تی[2] مقایسه گردید. درصد پارامترهای مختلف قبل قبل و بعد از انجماد به روش مدل خطی عمومی[3] در SAS (سیستم تحلیل آماری[4] 9.1.3) مورد آنالیز واریانس با اندازه‌گیری مکرر قرار گرفت. نتایج به صورت حداقل مربعات میانگین (Least Square Mean) و خطای معیار بیان شدند و مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

1- Liquid nitrogen (LN2)
2- T Test
3- General Linear Model(GLM)
4- Statistical Analysis System9.1.3

نتایج

میانگین نسبت تحرک اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد بین ۲ گروه واجد CLC و بدون CLC فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۲۴۳۴). به طور کلی در مدل مورد مطالعه، میانگین درصد تحرک اسپرم اپیدیدیمی گربه تحت تأثیر قرار گرفت (P<۰/۰۰۰۱). به طوری که میانگین درصد تحرک در گروه‌های واجد CLC (۳/۶±۲/۲۸ درصد) و فاقد CLC (۱/۱±۲/۰۲ درصد) نسبت به قبل از انجماد (۲۸/۳±۱/۸۲ درصد) به شدت کاهش یافت (P<۰/۰۰۰۱). اما وجود CLC نتوانست اثرات ناشی از انجماد را نسبت به گروه فاقد CLC بهبود ببخشد (P=۰/۴۲۸۱) (جدول ۱ و ۲).

میانگین نسبت زنده‌مانی اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد بین ۲ گروه واجد CLC و بدون CLC فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۴۴۷۶). میانگین درصد زنده‌مانی اسپرم در مدل مورد مطالعه تحت تأثیر قرار گرفته است (P=۰/۰۰۱۱). این تأثیر ناشی از فرایند انجماد بوده است، به طوری که درصد زنده‌مانی اسپرم در نمونه‌ی قبل از انجماد ۸۹/۹±۱/۹۴ درصد بوده است که بعد از انجماد در گروه واجد CLC ۸۰/۶±۲/۴۴ درصد و در گروه فاقد CLC ۷۸/۲±۲/۱۵ درصد بوده است و حضور CLC تأثیر بهبود دهنده‌ی قابل توجهی بر این فرایند نداشت (P=۰/۴۷۷۶؛ جداول ۱ و ۲).

جدول ۱: نسبت درصد تحرک، زنده‌مانی و قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی گربه (تعداد=۲۲ زوج) بعد از انجماد به قبل از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M)

	تحرک	زنده‌مانی	قطره پروتوپلاسمی
گروه واجد CLC	۰/۱۵±۰/۱[a]	۰/۹۲±۰/۰۴[a]	۰/۶۴±۰/۰۹[a]
گروه فاقد CLC	۰/۰۵±۰/۰۲[a]	۰/۸۸±۰/۰۳[a]	۰/۶۶±۰/۰۶[a]

- در هر ستون مقادیر واجد حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P>۰/۰۵).

جدول ۲: درصد تحرک، زنده‌مانی و قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی گربه (تعداد=۲۲ زوج) قبل از انجماد و بعد از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M)

	تحرک	زنده‌مانی	قطره‌ی پروتوپلاسمی
قبل از انجماد	۲۸/۲±۱/۸۲[b]	۸۹/۹±۱/۹۴[b]	۷/۴±۰/۸۵[a]
واجدCLC	۳/۶±۲/۲۸[a]	۸۰/۶±۲/۴۴[a]	۵/۷±۱/۰۷[a]
فاقد CLC	۱/۱±۲/۰۲[a]	۷۸/۲±۲/۱۵[a]	۵±۱/۰۰[a]

– در هر ستون مقادیر واجد حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P>۰/۰۵).

میانگین نسبت قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد بین ۲ گروه واجد CLC و بدون CLC فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۴۰۰۳). به طور کلی میانگین درصد قطره‌های پروتوپلاسمی در مدل مورد مطالعه تحت تأثیر قرار نگرفت (P=۰/۲۲۳۰)، به طوری که میزان قطره‌های پروتوپلاسمی در نمونه‌ی تازه ۷/۴±۰/۸۵ درصد، در گروه واجد CLC ۵/۷±۱/۰۷ درصد و در گروه فاقد CLC۵±۱/۰۰ درصد بود (جدول ۱ و ۲).

میانگین نسبت ناهنجاری‌های سر اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد بین ۲ گروه واجد CLC و بدون CLC فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۶۵۸۴). میانگین درصد ناهنجاری‌های سر در مدل مورد مطالعه تحت تأثیر قرار گرفت (P=۰/۰۴۲۸). این تأثیر ناشی از فرایند انجماد بوده است، به طوری که درصد ناهنجاری‌های سر اسپرم در نمونه‌ی قبل از انجماد ۱۸/۲±۱/۹۲ درصد بوده است که بعد از انجماد در گروه واجد CLC ۲۴/۶±۲/۴۱ درصد و در گروه فاقد CLC۲۵/۱±۲/۱۲ درصد بوده است و حضور CLC تأثیر محافظت‌کننده بر ناهنجاری‌های سر ناشی از فرآیند انجماد نداشت (P=۰/۸۶۸۱؛ جدول ۳ و ۴).

جدول ۳: نسبت ناهنجاری‌های سر، دم، سرکنده شده و قطعه‌ی میانی اسپرم اپیدیدیمی گربه (تعداد=۲۲ زوج) بعد از انجماد به قبل از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M)

	ناهنجاری‌های سر	ناهنجاری‌های دم	ناهنجاری سرکنده شده	ناهنجاری‌های قطعه‌ی میانی
واجدCLC	۱/۵±۰/۱۲[a]	۱/۱±۰/۰۴[a]	۱/۶±۰/۱۹[a]	۱/۳±۰/۱[a]
فاقدCLC	۱/۴±۰/۰۹[a]	۳/۵±۰/۵۶[b]	۱/۵±۰/۱۱[a]	۱/۴±۰/۱[a]

– در هر ستون مقادیر واجد حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P>۰/۰۵).

جدول ۴: درصد ناهنجاری‌های سر، دم، سرکنده شده و قطعه‌ی میانی اسپرم اپیدیدیمی گربه (تعداد=۲۲ زوج) قبل از انجماد و بعد از انجماد در دو گروه واجد CLC و فاقد CLC (LSMean±S.E.M)

	ناهنجاری‌های سر	ناهنجاری‌های دم	ناهنجاری سرکنده شده	ناهنجاری‌های قطعه‌ی میانی
قبل از انجماد	۱۸/۲±۱/۹۲[b]	۳۶/۳±۲/۶۴[b]	۱۶/۳±۱/۳[b]	۱۴/۱±۲/۲۵[a]
واجد CLC	۲۴/۶±۲/۴۱[a]	۴۰±۳/۳۱[ba]	۲۴/۱±۱/۶۳[a]	۱۸/۷±۲/۸۲[a]
فاقد CLC	۲۵/۱±۲/۱۲[a]	۴۴/۷±۲/۹۲[a]	۲۳/۶±۱/۴۴[a]	۲۰/۷±۲/۴۹[a]

– در هر ستون مقادیر واجد حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند(P>۰/۰۵).

میانگین نسبت سرهای کنده شده بعد از انجماد به قبل از انجماد بین دو گروه واجد CLC و بدون CLC فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۸۰۳۸). به طور کلی در مدل مورد مطالعه، میانگین درصد سرهای کنده شده به طور

قابل توجهی تحت تأثیر قرار گرفت (P=۰/۰۰۰۷). این تأثیر ناشی از فرایند انجماد بوده است، به طوری که درصد ناهنجاری سرکنده شده در نمونه‌ی قبل از انجماد ۱۶/۳±۱/۳ درصد بود که بعد از انجماد در گروه واجد CLC ۲۴/۱±۱/۶۳ درصد و در گروه فاقد CLC ۲۳/۶±۱/۴۴ درصد بود و حضور CLC تأثیر معنی‌داری بر بهبود اثرات ناشی از فرایند انجماد نداشته است (P=۰/۷۸۹۵؛ جداول ۳ و ۴).

میانگین نسبت ناهنجاری‌های دم اسپرم اپیدیدیمی گربه بعد از انجماد به قبل از انجماد در گروه فاقد CLC (۳/۵±۰/۵۶) بیش‌تر از گروه واجد CLC (۱/۱±۰/۰۴) بود (P=۰/۰۰۱۲). به طور کلی میانگین درصد ناهنجاری‌های دم در مدل مورد مطالعه، تحت تأثیر قرار نگرفت (P=۰/۱۲۵۴). با این حال، میزان ناهنجاری‌های دم در گروه فاقد CLC (۴۴/۷±۲/۹۲ درصد) به صورت معنی‌داری نسبت به قبل از انجماد (۳۶/۳±۲/۶۴ درصد) افزایش پیدا کرد (P=۰/۰۴۳۷) که به نظر می‌رسد CLC (۴۰±۳/۳۱ درصد) اثر بهبود دهنده‌ای بر وقوع ناهنجاری‌های دم نسبت به گروه فاقد CLC داشته است (P=۰/۳۸۸۱؛ جدول ۳ و ۴).

میانگین نسبت ناهنجاری‌های قطعه‌ی میانی بعد از انجماد به قبل از انجماد بین دو گروه واجد CLC و بدون CLC فاقد اختلاف معنی‌دار بود (P=۰/۵۹۴۹). در مدل مورد مطالعه میانگین درصد ناهنجاری‌های قطعه‌ی میانی تحت تأثیر قرار نگرفت (P=۰/۱۵۲۱). به طور کلی میزان ناهنجاری‌های قطعه‌ی میانی در نمونه‌ی تازه ۱۴/۱±۲/۲۵ درصد و در گروه واجد CLC ۱۸/۷±۲/۸۲ درصد و در گروه فاقد CLC ۲۰/۷±۲/۴۹ درصد بود که دارای اختلاف معنی‌دار نبود (P=۰/۱۵۲۱؛ جداول ۳ و ۴).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر اسپرم اپیدیدیمی گربه برای اولین بار به روش شیشه‌ای شدن بدون استفاده از سرمامحافظ‌های نفوذکننده با موفقیت منجمد شد. اسپرم گربه در گذشته با استفاده از روش آهسته منجمد شده است (Cocchia et al. 2010, Kashiwazaki et al. 2005, Vick et al. 2012).

شیشه‌ای سازی اسپرم بدون استفاده از سرمامحافظ‌های نفوذکننده‌ی یک افق جدید در کرایوبیولوژی اسپرم برای از بین بردن اثرات زیان‌آور سرمامحافظ‌ها ایجاد کرده است (Isachenko et al. 2003). اسپرم بز بومی خوزستان (Katanbafzadeh et al. 2014)، انسان (Isachenko et al. 2011)، ماهی (Merino et al. 2011) و سگ (Sanchez et al. 2011) به صورت موفق شیشه‌ای شده‌اند. در مطالعه‌ای که روی اثر سرمامحافظ‌های مختلف و شیشه‌ای کردن عاری از سرمامحافظ‌ها روی منی خرگوش انجام شده است نشان داده شد که شیشه‌ای کردن عاری از سرما محافظ‌ها باعث شده است که هیچ یا تعداد کمی از اسپرم-ها زنده بماند و غنی کردن محیط انجماد با مقادیر مناسب BSA به همراه سوکروز یا ترهالوز می‌تواند اثر خوبی روی زنده ماندن اسپرم بگذارد (Rosato and Iaffaldano 2013). تحرک و زنده‌مانی اسپرم در مطالعه‌ی حاضر تحت تأثیر قرار گرفت که ناشی از فرایند انجماد می‌باشد ولی استفاده از CLC نتوانست تأثیر به سزایی روی تحرک و زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی نسبت به گروه فاقد CLC بگذارد و نتایج این مطالعه با مطالعات قبل در خصوص اثر محافظتی CLC بر تحرک و زنده‌مانی اسپرم انطباق ندارد که می‌تواند ناشی از تغذیه‌ی گربه‌ها که دارای سطح کافی کلسترول است و تأثیر آن بر ترکیب غشای پلاسمایی اسپرم باشد. میزان تحرک اسپرم قبل از انجماد و بعد از یخ‌گشایی نسبت به مطالعات قبل (Cocchia et al. 2010, Kashiwazak et al. 2005, Vick et al. 2012) کم‌تر بوده است که دلیل آن می‌تواند تغذیه‌ی نامناسب گربه‌های ولگرد باشد. Katanbafzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۴ دریافتند که استفاده از CLC در فرایند شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی بز سبب کاهش حساسیت اسپرم اپیدیدیمی بز به شیشه‌ای شدن و همچنین باعث افزایش درصد تحرک و زنده‌مانی اسپرم شود.

در مطالعه‌ی حاضر درصد قطرات پروتوپلاسمی به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر فرایند شیشه‌ای شدن قرار نگرفت و حضور CLC تأثیر به سزایی بر آن‌ها نداشته است که با مطالعه‌ی Katanbafzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بز انطباق ندارد.

نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که فرایند شیشه‌ای شدن اثر شدیدی بر تعداد سرهای کنده شده اسپرم دارد که با مطالعه‌ی حسین‌زاده‌ثانی و همکاران در سال ۱۳۹۲ روی انجماد اسپرم بز تطابق دارد و اضافه کردن CLC به محلول شیشه‌ای شدن اثری بر بهبود این وضعیت نداشته است. ناهنجاری قطعه‌ی میانی تحت تأثیر فرایند شیشه‌ای شدن قرار نگرفته است که با مطالعه‌ی Katanbafzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بز انطباق دارد. ناهنجاری‌های دم تحت تأثیر شیشه‌ای شدن قرار نگرفته است اما به نظر می‌رسد CLC اثر بهبود دهنده‌ای بر وقوع این ناهنجاری داشته است. فرایند شیشه‌ای شدن به طور معنی‌داری ناهنجاری‌های سر اسپرم را افزایش داده است و حضور CLC تأثیر قابل توجهی نداشته است.

منابع

حسین‌زاده‌ثانی، سیدکمال‌الدین؛ براتی، فرید و خاکساری-مهابادی، محمود (۱۳۹۲). مشخصات مورفومتریک بیضه و اپیدیدیم و شاخص‌های اسپرم اپیدیدیمی در بز بالغ ایرانی، نشریه‌ی دامپزشکی (پژوهش و سازندگی)، شماره ۱۰۱، صفحات ۴۰-۴۷.

محمدی، قدرت‌اله و براتی، فرید (۱۳۸۸). تلقیح مصنوعی در حیوانات اهلی، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، چاپ اول، صفحات ۳۳، ۱۳۹-۱۲۳، ۱۸۸-۱۷۳.

Belmonte, S.A.; Lopez, C.I.; Roggero, C.M.; De Blas, G.A.; Tomes, C.N. and Mayorga, L.S. (2005). Cholesterol content regulates acrosomal exocytosis by enhancing Rab3A plasma membrane association. Developmental Biology, 285(2): 393- 408.

Cocchia, N.; Ciani, F.; El-Rass, R.; Russo, M.; Borzacchiello, G.; Esposito, V. et al. (2010). Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. Zygote, 18(1): 1-8.

Cormier, N. and Bailey, J.L. (2003). A differential mechanism is involved during heparin and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatzoa. Biology of Reproduction, 69(1): 177-185.

Guerrero, A.C. (2006). Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovinepididymal spermatozoa. Thesis submitted for fulfillment for the degree of Doctor of Philosophy, Louisiana State University.

Isachenko, E.; Isachenko, V.; Katkov, I.I.; Dessole, S. and Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. Reproductive BioMedicine Online, 6(2): 191-200.

Isachenko, V.; Isachenko, E.; Petrunkina, A.M. and Sanchez, R. (2012). Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: Birth of two healthy babies. Reproduction, Fertility and Development, 24(2): 323-326.

Isachenko, V.; Maettner, R.; Petrunkina, A.M.; Mallmann, P.; Rahimi, G. and Sterzik, K. et al. (2011). Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 ml) volume: A novel technology. Clinical Laboratory, 57(9-10): 643-650.

Kashiwazaki, N.; Yamaguchi, R.; Uesugi, R.; Hishiyama, N.; Kim, M. and Nakatsukasa, E. et al. (2005). Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. Journal of Reproduction and Development, 51(6): 735-739.

Katanbafzadeh, H.; Barati, F. and Tabandeh, M.R. (2014). Cryoprotectant-free freezing of the goat epididymal sperm. Cryoletters, 35(4): 293-298.

Kim, S.; Lee, Y.; Yang, H. and Kim, Y.J. (2012). Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. Animal Reproduction Science, 130(1-2): 111-118.

Merino, O.; Risopatron, J.; Sanchez, R.; Isachenko, E.; Figueroa, E.; Valdebenito, I. and Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. Animal Reproduction Science, 124(1-2): 125-131.

Moce, E.; Purdy, P.H. and Graham, J.K. (2010). Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. Animal Reproduction Science, 118(2-4): 236-247.

Moore, A.I.; Squires, E.L. and Graham, J.K. (2005). Adding cholesterol to the stallion spermplasma membrane improves cryosurvival. Cryobiology, 51(3): 241-249.

Purdy, P.H. and Graham, J.K. (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology, 48(1): 36-45.

Rosato, M.P. and Nicolaia, I. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. Theriogenology, 79(3): 508-516.

Sanchez, R.; Risopatron, J.; Schulz, M.; Villegas, J.; Isachenko, V. and Kreinberg, R. et al. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. Andrologia, 43: 233-241.

Vick, M.M.; Bateman, H.L.; Lambo, C.A. and Swanson, W.F. (2012). Improved cryopreservation of domestic cat sperm in a chemically defined medium. Theriogenology, 78(9): 2120-2128.

Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, 60-61: 481-492.

Effects of Cholesterol loaded cyclodextrin on vitrification of the cat epididymal sperm

Rahbar, M.[1]; Barati, F.[2]; Mohammadi, G.H.[2] and Mosalanezhad, B.[2]

Received: 15.01.2016 Accepted: 24.07.2016

Abstract

Cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) efficiently protected sperm of some species against cryodamage. On the other hand, vitrification of sperm especially in human opened a new horizon in the field of sperm freezing. The aim of the present study was to evaluate the effect of CLC on vitrification of cat sperm. The tom epididymal sperm (n=22 pairs) was extracted from epididymides and subjected to vitrification in TRIS based solution that was incorporated with or without CLC. The warmed sperm was analyzed for motility, viability and morphology. Vitrification significantly (P<0.0001) reduced the sperm motility (%) in CLC-plus (3.6±2.28) and CLC-minus (1.1±2.02) compared to the fresh samples (28.3±1.82). Sperm viability was also significantly decreased the following vitrification either with CLC (80.6±2.44) or without CLC (78.2±2.15) compared to the fresh samples (89.9±1.94; P=0.0011). In spite of the significant impact of vitrification on cat epididymal sperm, it seems that there is an indigenous tolerance to the vitrification procedure and CLC did not have more beneficial effect on it.

Key words: Cat, Cyclodextrin, Epididymal sperm and Vitrification

1- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Barati, F., E-mail: fabrtir@yahoo.com